Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg

(Direktor: Prof. Dr. med. G.W. Löhr)

Untersuchungen zur Wirkung von Antikörpern gegen saure Prostataphosphatase

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Heinz-Dieter Reiß

aus Kassel

Marburg a.d. Lahn

1968

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg

(Direktor: Prof. Dr. med. G.W. Löhr)

Untersuchungen zur Wirkung von Antikörpern gegen saure Prostataphosphatase

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Heinz-Dieter Reiß

aus Kassel

Marburg a.d. Lahn
1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 9. Juli 1968
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert
Referent: Prof. Dr. med. N. Lang
Correferent: Prof. Dr. med. G.W. Löhr

Meiner Mutter in Dankbarkeit gewidmet

Herrn Prof. Dr. med. N. Lang danke ich für die Vergabe der Arbeit und seine stets vorhandene Hilfsbereitschaft.
Herrn Prof. Dr. med. G.W. Löhr danke ich für die Übernahme des Correferates.

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einführung 1

Methodik 4

A. Gewinnung von saurer Prostataphosphatase 4

Isolierung von saurer Phosphatase mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie 4

Isolierung von saurer Phosphatase mit Hilfe selektiver Ammoniumsulfatfällungen 5

B. Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase 6

C. Bestimmung der Proteinkonzentration 7

D. Erzeugung der Antikörper gegen saure Prostataphosphatase 7

E. Nachweis der Antikörperbildung gegen saure Phosphatase 8

F. Anfärbung der Präzipitate 8

Proteinfärbung 8

Anfärbung mit Hilfe des BERGschen Reagenses 8

Anfärbung nach LÖFFLER u. BERGHOFF 9

G. Einfluß der Antiseren auf die Aktivität der sauren Phosphatase 9

H. Isolierung von Gammaglobulin aus den Kaninchenseren 10

Ergebnisse 11

A. Isolierung von saurer Phosphatase aus menschlichem Prostataadenomgewebe 11

B. Immunisierung von Kaninchen mit saurer Prostataphosphatase 13

C. Einfluß der Antiseren gegen saure Prostataphosphatase auf die Aktivität des Enzyms 19

Diskussion 31

Zusammenfassung 35

Schrifttumsverzeichnis 37

Lebenslauf 40

Akademische Lehrer 41

Einführung

Seit im Jahre 1938 GUTMAN u. GUTMAN (13) die Bestimmung der sauren Serumphosphatase in die Diagnostik des Prostatakarzinoms einführten, sind zahlreiche Untersuchungen über die Herkunft, die exakte Bestimmung und die klinische Bedeutung dieses Enzyms veröffentlicht worden. Doch erst 1945 gaben HUGGINS u. TALALAY (14) eine in der klinischen Routinediagnostik verwendbare, genügend einfache Methode — unter Verwendung des Phenolphthaleinphosphats als Substrat — an.

1947 schlugen dann ANDERSCH u. SZCZYPINSKI (2) das p-Nitrophenylphosphat und 1950 KIRBERGER u. MARTINI (15) das Di-Natriumphenylphosphat als Substrat vor. Das p-Nitrophenylphosphat erlaubt eine besonders einfache und zeitsparende Phosphatasebestimmung und wird daher überwiegend verwendet (29), daneben aber auch die beiden übrigen Verfahren.

Da die Phosphatasen die hydrolytische Spaltung von Phosphorsäureestern katalysieren, wird die Aktivität des Enzyms bei Verwendung des Phenolphthaleinphosphats anhand des freigesetzten Phenolphthaleins gemessen, bei Verwendung des Di-Natriumphenylphosphats anhand des freigesetzten Phenols und bei Verwendung des p-Nitrophenylphosphats anhand des freigesetzten p-Nitrophenols. Die Angabe der Enzymaktivität erfolgt in "Internationalen Einheiten" (IU). 1 IU ist definiert als diejenige Enzymmenge, die bei 25^0C in 1 Minute 1 µMol Substrat pro 1000 ml umsetzt, 1 mU also 1/1000 davon (International Union of Biochemistry, 1961).

Der Messung der sauren Phosphatase im Serum mit den üblichen Verfahren kommt keinerlei Organspezifität zu. Deshalb setzten frühzeitig Versuche ein, durch Auftrennung der im Sammelbecken "saure Phosphatase" enthaltenen Enzyme aus verschiedenen Organen eine Aussage über die Organherkunft einer Erhöhung der sauren Phosphataseaktivität im Serum zu ermöglichen.

Es stellte sich bei diesen Untersuchungen heraus, daß die saure Serumphosphatase in erster Linie Anteile aus Thrombocyten, Erythrocyten, Knochen, Niere und Prostata enthält. Der größte Teil der normalerweise vorkommenden Phosphataseaktivität dürfte wohl aus den Erythrocyten stammen, während der Prostataanteil bei gesunden Personen nur sehr gering ist. Beim Morbus GAUCHER kommt es zu einer starken Erhöhung einer sauren Phosphatase im Serum, deren Herkunft (Milz?) noch ungeklärt ist (25).

Da die Bestimmung der sauren Phosphatase bisher nur in der Diagnostik des Prostatakarzinoms größere Bedeutung erlangt hat, zielten die Versuche meistens darauf ab,

eine Auftrennung in einen prostatischen und einen nichtprostatischen Anteil zu ermöglichen.

Zur Auftrennung der Phosphatasen bieten sich zwei Möglichkeiten an: Einmal die zumindest teilweise vorhandene Substratspezifität der einzelnen Komponenten und zum anderen die selektive Hemmung einer Komponente durch bestimmte chemische Substanzen. BABSON u. Mitarbeiter (3) untersuchten die Substratspezifität von Extrakten aus menschlichen Erythrocyten und Ejakulaten. Nach ihren Ergebnissen eignet sich zur Erfassung der sauren Prostataphosphatase das α-Naphthylphosphat besser als das β-Glycerophosphat und wesentlich besser (40- bis 100mal) als das Phenylphosphat, das Phenolphthaleinphosphat, das p-nitrophenylphosphat und das β-Naphthylphophat. In die klinische Diagnostik haben diese Differenzierungsmöglichkeiten wegen ihrer Kompliziertheit bisher keinen Eingang gefunden.

Größere Bedeutung hingegen haben hier die auf einer selektiven Hemmung einer Phosphatasekomponente beruhenden Verfahren gewonnen. Nach ABUL-FADL u. KING (1) ist die Prostataphosphatase durch L(+)-Tartrat, nach LINHARDT u. WALTER (19) die Erythrocytenphosphatase durch Formaldehyd und Kupfer-Ionen weitgehend hemmbar.

Ausführliche Untersuchungen über die Bedeutung der tartrathemmbaren Phosphatase für die Früherfassung des Prostatakarzinoms veröffentlichten RICHTERICH u. Mitarbeiter (24) sowie PETERSON jr. (23). RICHTERICH u. Mitarbeiter fanden eine Erhöhung der Prostataphosphatase bei allen Patienten mit metastasierendem Prostatakarzinom und bei dreiviertel der Karzinompatienten ohne Metastasen. Die gesamte im Serum meßbare saure Phosphataseaktivität war in der Hälfte der Fälle nur unwesentlich erhöht, so daß also die Bestimmung der Prostatakomponente die Erfassung von doppelt soviel Karzinompatienten erlaubte wie die Bestimmung der Gesamtphosphatase. Andererseits ergab sich, daß beim Prostatakarzinom auch die nichtprostatische Phosphatasekomponente ansteigen kann. Es muß dafür entweder die gleichzeitige Freisetzung von nichtprostatischer Phosphatase oder eine mangelhafte Hemmung der Prostatakomponente durch L(+)-Tartrat verantwortlich gemacht werden. PETERSON jr. konnte demgegenüber zeigen, daß nur etwa 10% der Patienten mit einem Prostatakarzinom eine Erhöhung der Prostatakomponente ohne eine wesentliche Erhöhung der Gesamtphosphatase aufweisen. Ebenfalls 10% der Karzinompatienten hatten nur eine Erhöhung der Gesamtphosphatase ohne Erhöhung des Prostataanteils. Da außerdem von 139 Patienten ohne Prostatakarzinom keiner eine Erhöhung der Gesamtphosphatase, jedoch über 3% eine

Erhöhung der Prostatakomponente aufwiesen, kommt PETERSON jr. zu dem Ergebnis, daß bis zum Vorliegen einer genaueren Methodik die Bestimmung der Gesamtphosphatase zur Diagnostik des Prostatakarzinoms genügt. Eine Unsicherheit bei den angeführten Untersuchungen besteht natürlich auch darin, daß die Aussage, ob ein Prostatakarzinom vorliegt bzw. ob Metastasen vorhanden sind, besonders in der Frühphase, mit den zum Vergleich heranziehbaren Methoden nahezu unmöglich ist.

Es sind in diesem Zusammenhang experimentelle Beobachtungen von TAGNON u. STEENS-LIEVENS (27, 28) von Bedeutung. Sie fanden eine reversible Hemmung der sauren Phosphatase aus normalem Prostatagewebe und aus Prostataadenomen durch ionisiertes Kalzium, nicht dagegen eine Hemmung der aus einem Prostatakarzinom isolierten Phosphatase. Aufgrund dieses Befundes werden zwei Theorien diskutiert: Entweder es findet im Laufe der Karzinomentstehung eine Änderung der chemischen Struktur der sauren Phosphatase statt oder es handelt sich von vornherein bei dem aus den Karzinomzellen freiwerdenen Enzym um ein von der normalerweise in der Prostata vorhandenen Phosphatase verschiedenes Enzym.

Sowohl die bisher unbefriedigende Auftrennung der verschiedenen bei der sauren Phosphatasebestimmung erfaßten Enzymkomponenten als auch die Frage einer Karzinomspezifität der sauren Prostataphosphatase verlangen nach weiteren Untersuchungen. In Anlehnung an die Möglichkeiten, die immunologische Methoden in der Differenzierung der Gewebsherkunft von Proteinen im Serum bieten, erschienen auch hier immunologische Untersuchungen besonders geeignet. Es sollten die Antigeneigenschaft und -spezifität sowie der Einfluß des Antikörpers auf die Aktivität des Enzyms geprüft werden.

Während über die alkalische Phosphatase in dieser Hinsicht bereits ausführliche Untersuchungsergebnisse vorliegen (26), stehen bezüglich der sauren Phosphatase lediglich einige das Problem nur am Rande berührende Untersuchungen zur Verfügung. LEITHOFF u. GENKEL (17) konnten bei der Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Samenplasma 11 als organspezifisch bezeichnete Proteinfraktionen nachweisen. Zwei dieser Fraktionen sollen der Prostata entstammen, eine von diesen enthält in der Immunelektrophorese saure Phosphataseaktivität. BARNES u. Mitarbeiter (4) fanden bei der Immunisierung von Ratten mit menschlichem Prostatasekret 5 wahrscheinlich organspezifische Antigene, darunter die saure Phosphatase, der sie die größte antigene Wirksamkeit der im Prostatasekret enthaltenen Proteine zuweisen. Eingehendere Untersuchungen über die Beeinflussung der Aktivität des Enzyms durch den Antikörper sind bisher nicht bekannt geworden.

Methodik

A. Gewinnung von saurer Prostataphosphatase

Zur Gewinnung der sauren Phosphatase aus Prostatagewebe boten sich unter den beschriebenen Verfahren das von BOMAN (7) angegebene, auf Ionenaustauschchromatographie beruhende,und das von DAVIDSON u. FISHMAN (9) erarbeitete, auf selektiven Ammoniumsulfatfällungen basierende, an. Ich habe beide Verfahren zur Enzymgewinnung herangezogen.

Ausgangsmaterial: Um möglichst native Phosphatase zu erhalten, verzichtete ich auf autoptisch gewonnenes Material und verwandte nur operativ gewonnenes Prostatagewebe. Es handelte sich dabei ausschließlich um Gewebe, das durch Prostataektomien bei Patienten mit sgn. Prostatahypertrophie erhalten wurde und histologisch keine maligne Entartung zeigte. Sofort nach der operativen Entnahme wurde das Gewebsmaterial bei -20^0 eingefroren. Bis zur Weiterverarbeitung vergingen nie mehr als 24 Stdn.

Da größere Mengen saurer Phosphatase benötigt wurden, schied die Isolierung aus Samenplasma aus (21).

Isolierung von saurer Phosphatase mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie

Als Ionenaustauscher wurde das kernsulfonierte Polystyrolharz Dowex 50 W mit einer nominellen Siebzahl von 50-100 mesh und einem Vernetzungsgrad von 2% verwandt. Zur Vorbereitung (22) wurde das Harz mit 4n HCl in einem Büchnertrichter gewaschen. Dabei wurden etwa 5 Ltr. Säure für 500 g Harz gebraucht. Anschließend wurde zweimal mit Aqua dest. nachgespült und dann bis zum Auftreten einer deutlich alkalischen Reaktion des Filtrates mit 2n NaOH gewaschen. Anschließend wurde das Harz in der dreifachen Menge 1n NaOH aufgeschwemmt; diese Aufschwemmung 3 Stdn. über einem Dampfbad erhitzt und, nachdem das Harz sich abgesetzt hatte, der Überstand abgesaugt und mehrere Male — bis zur Klärung — durch heiße 1n NaOH ersetzt und wieder abgesaugt. Durch Waschen mit Aqua dest. wurde das Alkali entfernt und das Harz dann in der doppelten Menge 0,1m Natriumcitratpuffer, pH 3,4, aufgelöst. Nach Entfernung sämtlicher Luftblasen durch vorsichtiges Umrühren wurde das gelöste Harz auf eine 72 x 3,3 ccm große, am Boden mit einem Glasfilter versehene Glassäule gegeben (8) und gewartet, bis es sich abgesetzt hatte. Dann wurde die Säule mit Citratphosphatpuffer, pH 5,5, ins Gleichgewicht gebracht.

Nach Gebrauch wurde das Harz mit 2n NaOH wieder regeneriert.-

Das gefrorene Prostatagewebe wurde in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten und in etwa der fünffachen Menge einer 0,01proz. Lösung von Tween 80 35 Stdn. lang extrahiert, anschließend wurde durch Glaswolle filtriert und das Filtrat drei Tage gegen Aqua dest. dialysiert. Ein sich dabei u. U. bildender Niederschlag wurde abzentrifugiert und dann das Dialysat wieder bei -20°C gelagert. Zur Beschickung einer Säule wurden 500 mg des gefrorenen Dialysats in ca. 30 ml Citratphosphatpuffer, pH 5,5, aufgelöst und nach 10stündiger Dialyse gegen den gleichen Puffer auf die Säule gegeben. Sobald das Dialysat in das Harz eingelaufen war, wurden dann 60 ml Citratphosphatpuffer, pH 5,5, nachgegeben und anschließend mit dem gleichen Puffer bei kontinuierlichem pH-Wechsel von 5,5 auf 6,0 eluiert. Nachdem ca. 40 ml aus der Säule abgeflossen waren, wurden, bei einer Ausflußgeschwindigkeit von 15-20 ml/h, 50 Fraktionen von je 6 ml aufgefangen und in jeder Fraktion die Enzymaktivität und der Eiweißgehalt bestimmt. Die vier Fraktionen, in denen sich die höchste Aktivität fand, wurden weiterverwandt, die übrigen verworfen. Die Einengung erfolgte durch Vakuumdestillation.

Isolierung von saurer Phosphatase mit Hilfe selektiver Ammoniumsulfatfällungen

Das gefrorene Prostatagewebe wurde wiederum in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten und dann die gleiche Menge zerbröckeltes Eis und die vierfache Menge eisgekühlter Triscitratpuffer, pH 3,7, hinzugefügt. Anschließend wurden die aufgeschwemmten Gewebsteile in einem Homogenisator (Ultra-Turrax, Fa. Janke und Kunkel, Typ 18/2) 1 Min. lang bei 16000 U/min (25 g) in kleinen Portionen homogenisiert und das Homogenat dann durch Filterpapier Nr. 595 bei 4°C filtriert. Das Filtrat wurde nur dann weiterverwandt, wenn die saure Phosphataseaktivität in ihm mehr als 30 Einheiten/mg Protein betrug. (Zur Methodik der Bestimmung der sauren Phosphatase sowie der Proteinbestimmung siehe S. 6 u. 7). Bei ausreichender Aktivität wurden dem Filtrat 2/3 seiner Menge Triscitratpuffer, pH 3,7, und anschließend soviel 1:10 verdünnte Ammoniaklösung zugefügt, bis der pH-Wert von vorher etwa 4,2 auf 7,5 bis 8,5 angestiegen war. Die pH-Wert-Messungen wurden mit einer Glaselektrode (Knick-Labor-pH-Meter, Typ 290) vorgenommen (Genauigkeit $\pm$ 5%). Danach ließ ich die Lösung in einem eisgekühlten Gefäß erstarren und fügte festes Ammoniumsulfat bis zu 65proz. Sättigung unter ständigem Rühren hinzu. Die Berechnung der für diesen Sättigungsgrad erforderlichen Menge Ammoniumsulfat erfolgte nach der von KUNITZ (16) angegebenen Formel:

$$X = \frac{53{,}3 \cdot (S_2 - S_1)}{1 - 0{,}3 \cdot S_2};$$

X ist dabei die Menge $(NH_4)_2SO_4$ in g, die 100 ml Lösung zugefügt werden muß; S_1 die Sättigung der Lösung vor dem Hinzufügen und S_2 die Sättigung der Lösung nach dem Hinzufügen der Menge X (ausgedrückt in Bruchteilen der Sättigung bei 23°C). In diesem speziellen Fall ist also $S_1 = 0$. Nachdem das zugefügte Ammoniumsulfat voll gelöst war, wurde die Lösung 10 Min. lang mit 20 000 U/min (43 g) bei 0°C zentrifugiert. Der Überstand (I) wurde verworfen, der Bodensatz in einer kleinen Menge Triscitratpuffer, pH 3,7, aufgelöst (pH dann 4,5), die Lösung in einem eisgekühlten Gefäß zum Erstarren gebracht und wiederum mit festem Ammoniumsulfat bis 45% abgesättigt. Dabei ging ich von der Voraussetzung aus, daß die Lösung vorher ammoniumsulfatfrei war. In dem durch erneutes Zentrifugieren erhaltenen Überstand (II) war bereits in hohem Maße saure Phosphatase vorhanden. Ich habe jedoch, um die spezifische Aktivität (siehe S. 11) weiter zu steigern, den Bodensatz noch einmal mit Triscitratpuffer aufgeschwemmt, erneut mit Ammoniumsulfat auf 45% abgesättigt und wiederum zentrifugiert. Dieser Überstand (III) wurde für die weiteren Untersuchungen verwandt, nachdem durch 48stündige Dialyse gegen phys. Kochsalzlösung und anschließender Einengung durch Vakuumdestillation der Ammoniumsulfatrest entfernt worden war.

B. Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase

Es wurden folgende Verfahren angewandt:

I. Nach DAVIDSON u. FISHMAN (9) diente als Substrat eine 1proz. Di-Natriumphenylphosphatlösung, aus der durch die saure Phosphatase Phenol freigesetzt wird. Durch Zusatz von Folin-Ciocalteu-Reagens und Natriumkarbonatlösung bildet sich ein blauer Farbstoff, dessen Intensität im Eppendorf-Photometer bei 600 mμ gemessen und über eine Eichkurve in mg freigesetztes Phenol umgerechnet wird. Eine Einheit (= E) ist die Enzymmenge, die 1 mg Phenol in 1 Stunde freisetzt.

Im einzelnen: 5 ml Citratpuffer, pH 4,9, + 0,5 ml 0,03proz. Rinderalbuminlösung + 0,5 ml des zu messenden Enzyms (bei hohen Aktivitäten vorherige Verdünnung mit Citratpuffer) + 1 ml 1proz. Di-Natriumphenylphosphatlösung. Inkubationszeit: 15 Min. bei 37,5°C. Dann Hinzufügen von 1 ml Folin-Ciocalteu-Reagens, 2 ml Aqua dest. und 2,5 ml 20proz. Natriumkarbonatlösung.

II. Bei den meisten Bestimmungen wurde das heute weitgehend benutzte Verfahren angewandt, bei dem p-Nitrophenylphosphat als Substrat dient. Nach Abspaltung des Phosphats durch das Enzym wird die entstehende Gelbfärbung — durch das in alkalischer Lösung entstandene p-Nitrophenol bedingt — gemessen und die freigesetzte Menge an p-Nitrophenol als Maß für die Phosphataseaktivität gesetzt (2,29).

Im einzelnen: 1,5 mg p-Nitrophenylphosphat-Natrium, gelöst in 1 ml 0,05 m Citratpuffer, pH 4,8, und 0,2 ml des zu messenden Enzyms werden 30 Min. bei 37,5°C inkubiert und dann 10 ml 0,02n NaOH hinzugefügt. Ablesung der Extinktion im Eppendorf-Photometer bei 405 mμ.

Die Meßwerte werden in "Internationalen Einheiten" (= IU) angegeben, gemäß der Definition der International Union of Biochemistry (siehe S. 1).

III. Zur Feststellung der Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen bei der Ionenaustauschchromatographie eignete sich am besten das von BOMAN selbst (7) angegebene Schnellverfahren, das mit kleinsten Mengen arbeitet. Allerdings ist durch die kurze Inkubationszeit (1 Min. im Eiswasserbad) ein größerer Unsicherheitsfaktor gegeben.

Im einzelnen: 0,2 ml 0,02m p-Nitrophenylphosphat-Natrium-Lösung (Lösungsmittel ist wie unter II. Citratpuffer) + 0,01 ml zu messendes Enzym. Nach der Inkubationszeit Hinzufügung von 2 ml 0,1n NaOH.

Bei allen Bestimmungsverfahren wurde bei jeder Messung ein Leerwert mitgeführt.

C. Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinmengen über 0,05 g/100 ml wurden mit Hilfe des Biuretreagens gemessen. Die Bestimmung kleinerer Konzentrationen erfolgte durch Messung der UV-Extinktion der Lösung in einer Quarzküvette bei 280 mμ im Beckman-Spectrophotometer DB. Zur Umrechnung in mg Protein diente eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin der Behringwerke Marburg.

D. Erzeugung der Antikörper gegen saure Prostataphosphatase

Das gereinigte Enzym wurde nach wiederholter Einengung durch Vakuumdestillation mit anschließender Dialyse gegen phys. Kochsalzlösung zur Immunisierung von vier Kaninchen verwandt. Zwei Tiere wurden mit dem durch Ionenaustauschchromatographie

gewonnenem und zwei mit dem durch Ammoniumsulfatfällungen gewonnenem Enzym immunisiert. Als Adjuvans wurde bei drei Tieren Aluminiumhydroxydgel zu gleichen Teilen, bei einem Tier komplettes FREUNDsches Adjuvans (Difco Laboratories, Detroit/USA) verwandt. In Abständen von jeweils vier Tagen wurde dreimal 1 ml i.p. injiziert. Nach weiteren fünf Tagen erfolgte eine i.v. Auffrischinjektion. Drei Tage später entnahm ich zum ersten Mal Blut. Danach wurden von Zeit zu Zeit weitere Auffrischinjektionen gegeben, um Seren mit möglichst gleichbleibendem Antikörpertiter zu erhalten.

Die Seren wurden bei -20°C ohne Zusätze gelagert. Kurzfristige Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank bei +4°C.

E. Nachweis der Antikörperbildung gegen saure Phosphatase

Ich wandte zwei Techniken an: Den Geldiffusionstest nach OUCHTERLONY (12) und die Immunelektrophorese nach GRABAR (11). Als Trägersubstanz benutzte ich in beiden Fällen Reinagar der Behringwerke Marburg, 2proz. für die Immunelektrophorese und 1proz. für Geldiffusionsplatten. Bei der Herstellung des Agars wurde nach den Richtlinien der Behringwerke verfahren. Zur Immunelektrophorese beschichtete ich Objektträger mit 3 ml heißer Agarlösung, bei den Geldiffusionstesten Glasplatten von 3x3 qcm mit 5 ml heißer Agarlösung. Die Proteine wurden in einer feuchten Kammer bei 100 V und 40 Amp. in 2 Stdn. elektrophoretisch aufgetrennt.

F. Anfärbung der Präzipitate

Proteinfärbung: Die Agarplatten wurden mindestens 30 Stdn. in phys. Kochsalzlösung gewässert, um die nicht präzipitierten Porteine auszuwaschen. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die Platten etwa 30 Min. lang mit 0,5proz. Amidoschwarzlösung überschichtet und dann mit einem Methanol/Eisessig-Gemisch (Verhältnis 9:1) der überschüssige Farbstoff abgewaschen.

Anfärbung mit Hilfe des BERGschen Reagenses

Zum Nachweis, daß in den Präzipitaten saure Phosphatase gebunden ist, d.h., daß die sich darstellenden Präzipitationslinien wirklich durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen saurer Phosphatase und den von mir erzeugten Antikörpern entstanden sind,

wurden (wiederum nach 48stündigem Wässern in phys. Kochsalzlösung) die Platten mit dem von BERG (5) angegebenem Reaktionsgemisch für 12 Stdn. überschichtet. Diese Reaktionslösung besteht aus einem Pufferanteil (Essigsäure/Natriumacetat-Puffer) und einem Gemisch aus Kalzium-α-Naphthylphosphat und Dianisyltetrazoniumchlorid im Verhältnis 5:3 sowie 10proz. Natriumlaurylsulfonat.

Da Kalzium-α-Naphthylphosphat nicht im Handel erhältlich ist, mußte es nach dem von KATTE vorgeschlagenen Verfahren hergestellt werden (5). Ist in einem Präzipitat saure Phosphatase vorhanden, so setzt diese aus dem Kalzium-α-Naphthylphosphat das α-Naphthol frei, das mit dem Dianisyltetrazoniumchlorid unter Bildung eines blauvioletten Azofarbstoffes reagiert. Verwendet man Anthrachinon-α-Diazoniumchlorid anstelle des Dianisyltetrazoniumchlorids, so entsteht ein orangeroter Azofarbstoff (6). Das Natriumlaurylsulfonat dient zur Erhöhung der Oberflächenaktivität. Die Spezifität der Reaktion ist durch die Einstellung des Puffers auf pH 5 weitgehend gesichert. Nachteilig für den Ausfall der Reaktion ist nach LEITHOFF u. LEITHOFF (18) der Zusatz von Natriumazid als Konservierungsmittel zu den Antiseren. Ich habe deshalb auf den Zusatz von Natriumazid verzichtet.

Zum Nachweis saurer Phosphatase in den Präzipitaten erwies sich weiterhin ein von LÖFFLER u. BERGHOFF (20) für den cytochemischen Nachweis des Enzyms angegebenes Verfahren als geeignet. Die luftgetrockneten Agarplatten wurden in diesem Falle mit einer Inkubationslösung, bestehend aus Veronalacetat/HCl-Puffer nach Michaelis, pH 6,3 bis 6,5, in dem Natrium-α-Naphthylphosphat und Echt-Granatsalz (= Diazoniumsalz des O-Aminoazotoluol) zu gleichen Teilen gelöst waren, überschichtet. Hierdurch entsteht im Bereich der Präzipitate mit saurer Phosphataseaktivität eine rotbraune Verfärbung.

G. Einfluß der Antiseren auf die Aktivität der sauren Phosphatase

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte mit dem bereits früher beschriebenem Verfahren (siehe S. 7, II); mit p-Nitrophenylphosphat-Natrium als Substrat. Der Verdünnungseffekt, der durch Hinzufügung des Antiserums bzw. der darüber hinaus geprüften Seren und Proteinlösungen entstand, wurde stets bei der Berechnung der Enzymaktivität berücksichtigt. Es wurde immer eine Doppelbestimmung vorgenommen. Ergab sich dabei eine mehr als 10proz. Abweichung wurde noch eine dritte Bestimmung vorgenommen. Wenn nicht besonders angegeben, wurden Enzym und Antikörper 45 Min. im

Wasserbad bei 37,5°C inkubiert. Danach wurde das Puffer/Substrat-Gemisch zugesetzt und wie früher beschrieben weiterverfahren.

Die zum Teil recht hohe Eigenaktivität der verwandten Kaninchenseren an saurer Phosphatase (durchschnittlich 20 mU/ml)wurde bei allen Messungen berücksichtigt.

H. Isolierung von Gammaglobulin aus den verwandten Kaninchenseren

Um den Effekt von Gammaglobulin aus Antiseren und aus Normalseren von Kaninchen und den Effekt der in erster Linie Albumin enthaltenden Restfraktion auf die Enzymaktivität festzustellen, wurde das Gammaglobulin durch Ammoniumsulfat gefällt.

Dazu wurden 5,7 ml im Verhältnis 1:3 mit phys. Kochsalzlösung verdünntes Serum mit 4,3 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Das Gemisch wurde bei 20 000 U/min (43 g) zentrifugiert und der Bodensatz mehrfach mit 5 ml 43proz. Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Zur Entfernung des Ammoniumsulfats wurde der in Citratpuffer, pH 4,8, aufgelöste Bodensatz mindestens 48 Stdn. gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die anschließende Einengung durch Vakuumdestillation wurde solange fortgeführt, bis eine etwa dem ursprünglichen Proteingehalt des Serums entsprechende Eiweißkonzentration erreicht war.

Die Kontrolle des gewonnenen Gammaglobulins auf Reinheit erfolgte durch Papier- und Immunelektrophorese. Hierfür stellten die Behringwerke Marburg freundlicherweise Antikaninchenserum von der Ziege zur Verfügung. Ich bezeichnete das Gammaglobulin als weitgehend rein, wenn in der Papierelektrophorese nur noch eine minimale Konzentration von Albumin, Alpha-1-, Alpha-2- und Beta-Globulinen (insgesamt maximal 10% des Gesamtproteins) vorhanden war. Der nach dem Zentrifugieren des mit Ammoniumsulfat gesättigten Serums verbleibende Überstand wurde ebenfalls 48 Stdn. gegen Citratpuffer, pH 4,8, dialysiert und ebenfalls soweit eingeengt, daß die Proteinkonzentration nahezu der des nativen Serums entsprach.

Ergebnisse

A. Isolierung von saurer Phosphatase aus menschlichem Prostataadenomgewebe

Die von mir mit den Verfahren von BOMAN (7) und von DAVIDSON u. FISHMAN (9) — ausführliche Darstellung Seite 4 ff — gewonnenen Ergebnisse sollen im folgenden kurz den von diesen Autoren publizierten Ergebnissen gegenübergestellt werden (Tab. I).

Tabelle I

Gegenüberstellung der von BOMAN und der von DAVIDSON u. FISHMAN erzielten Ergebnisse bei der Isolierung saurer Phosphatase aus menschlichem Prostatagewebe mit den eigenen, unter Verwendung der gleichen Methodik, erhaltenen Ergebnissen.

Isolierung n. Boman [m Mol / Ext. 280]		Isolierung n. Davidson a. Fishman [Einheiten / mg Protein]	
Ergebnisse von Boman	eigene Ergebnisse	Ergebnisse von Dav. a. Fishm.	eigene Ergebnisse
max. 2,8	2,4	max. 2455	2520
	2,3		2613
	1,9		3120
	2,7		1815
	2,7		2410
	2,1		2321
	2,8		2417
	2,9		2815
	2,9		3046
	2,3		2387

BOMAN gibt maximal eine spezifische Aktivität von 2,8 mMol an. Unter "spezifischer Aktivität" ist die Enzymaktivität einer Lösung bezogen auf ihren Proteingehalt zu verstehen. (BOMAN bezieht bei seinen Angaben die Aktivität der sauren Phosphatase — Bestimmungsmethode S. 7, III — direkt auf die UV-Extinktion der Lösung bei 280 mμ - S. 7). Bei 10 eigenen Versuchen ergab sich maximal eine spezifische Aktivität von 2,9 mMol.

Im Gegensatz zu BOMAN fand sich in allen 10 Versuchen bei der graphischen Aufzeichnung der Phosphataseaktivität im Eluat der Ionenaustauschsäule konstant ein zweifaches Aktivitätsmaximum (Abb. 1). Ein erstes Maximum lag bei Fraktion 19, ein zweiter weitaus kleinerer Gipfel bei Fraktion 27. Das Maximum der Eiweißkonzentration fand sich

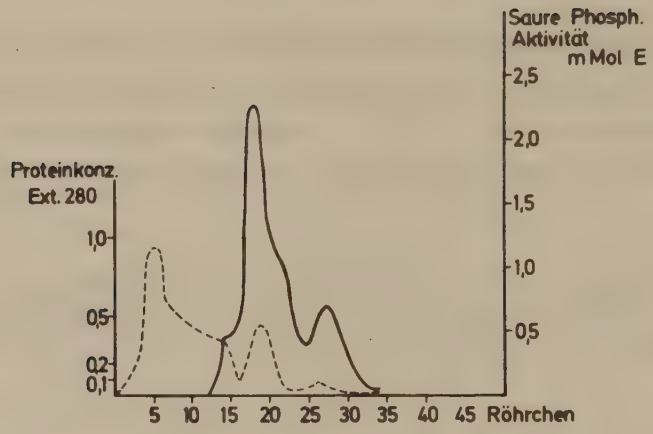


Abbildung 1

Chromatographische Auftrennung eines Extraktes aus menschlichem Prostatagewebe nach BOMAN.
Unterbrochene Linie: Proteinkonz. Durchgehende Linie: Saure Phosphatase-Aktivität.
Jedes Röhrchen enthält 6 ml.

in Fraktion 6. Wegen der höheren Aktivität wurden nur die dem ersten Gipfel entsprechenden Fraktionen (17-20) weiterverwendet. Wie aus dem Folgenden hervorgeht, reichte die sich ergebende spezifische Aktivität zur Bearbeitung meiner Fragestellungen aus.

DAVIDSON u. FISHMAN geben maximal eine spezifische Aktivität von 2455 Einheiten/mg Protein an (Bestimmung der sauren Phosphatase S. 6, I; Proteinbestimmung S. 7). Bei 10 eigenen Versuchen nach diesem Verfahren ergab sich maximal eine spezifische Aktivität von 3120 Einheiten/mg Protein.

Beim Vergleich der mit den beiden Verfahren erhaltenen spezifischen Aktivitäten läßt sich sagen, daß man mit beiden zu annähernd gleichen Ergebnissen kommt, obwohl prinzipiell völlig verschiedene Wege beschritten werden, nämlich einmal die Isolierung des Enzyms durch selektive Ammoniumsulfatfällungen, zum anderen mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie. Die spezifische Aktivität ist zwar bei dem Verfahren nach DAVIDSON u. FISHMAN etwas niedriger, dafür ist jedoch die bei einer Einzelisolierung gewonnene Enzymmenge um ein Vielfaches höher als beim Verfahren nach BOMAN. Man wird immer dann, wenn es auf einen möglichst hohen Reinheitsgrad des Enzyms

ankommt, das Verfahren nach BOMAN anwenden; in anderen Fällen, in denen mehr die Anreicherung einer hohen "Aktivität" gewünscht wird, genügt die Ammoniumsulfatfällungsmethode. Vorwegnehmend darf gesagt werden, daß sich in allen von mir ausgeführten, die Immunpräzipitation und die Immunhemmung bzw. -aktivierung betreffenden Untersuchungen kein Unterschied zwischen den mit den beiden verschiedenen Verfahren isolierten sauren Phosphatasen fand.

Auffällig war eine starke Schwankungsbreite in der spezifischen Aktivität bei den einzelnen Versuchen. Es darf wohl angenommen werden, daß diese in erster Linie auf einer unterschiedlichen Ausgangsaktivität an saure Phosphatase der aus verschiedensten Operationspräparaten entnommenen Gewebsstückchen beruhte. Eine unterschiedliche Alterung spielte dagegen keine Rolle, da in dieser Hinsicht bei den einzelnen Versuchen weitgehend konstante Bedingungen eingehalten wurden.

B. Immunisierung von Kaninchen mit saurer Prostataphosphatase

Vier Kaninchen wurden mit isolierter saurer Prostataphosphatase immunisiert und der Nachweis erfolgter Antikörperbildung mit Hilfe der Immunelektrophorese und dem Geldiffusionstest geführt (S. 8 u. 9).

Knapp drei Wochen nach der ersten i.p. Injektion zeigte sich erstmals eine noch schwach ausgebildete Präzipitationslinie im α-Globulin-Bereich (Abb. 2). Nach weiteren 3 Wochen bildete sich diese Linie voll aus. Gleichzeitig zeigte sich, allerdings nur bei dem mit FREUNDschem Adjuvans immunisierten Tier, eine weitere nur schwache Präzipitationslinie, ebenfalls im α-Globulin-Bereich (Abb. 3). Der zur Immunisierung verwandte Gewebsextrakt war also bezüglich der sauren Phosphatase keineswegs als "rein" anzusprechen, wenn auch diese als das antigenstärkste Protein darin angesehen werden darf. Darüberhinaus ließ sich bei allen späteren Immunisierungen der Tiere keine weitere Präzipitationslinie erzielen.

Der Beweis, daß es sich bei den mit den vier Antiseren darstellbaren Präzipitationslinien tatsächlich um Antigen-Antikörperreaktionen zwischen saurer Phosphatase und dem entsprechenden Antikörper handelt gelang mit Hilfe des BERGschen Reaktionsgemisches (5) und dem von LÖFFLER u. BERGHOFF (20) angegebenen Verfahren (Abb. 4 und 5).

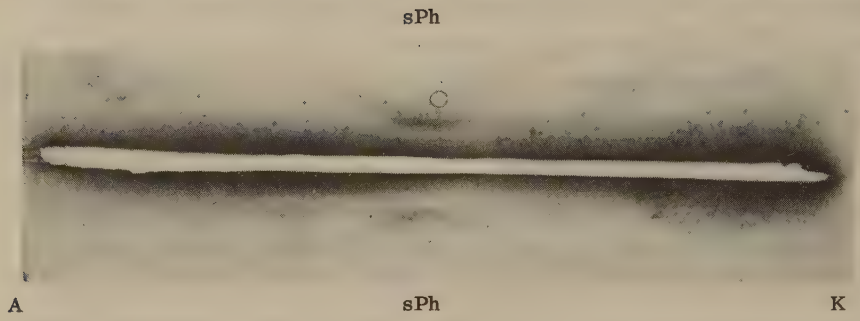


Abbildung 2

Immunelektrophorese von saurer Prostataphosphatase (sPh) gegen ein Anti-saure-Phosphatase-Serum vom Kaninchen (AS 367) nach dreiwöchiger Immunisierung des Tieres. (A = Anode, K = Kathode)

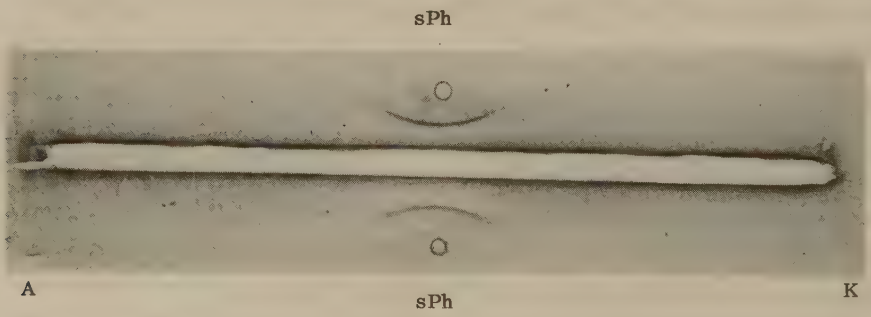


Abbildung 3

Immunelektrophorese von saurer Prostataphosphatase (sPh) gegen ein Anti-saure-Phosphatase-Serum vom Kaninchen (AS 367) nach sechswöchiger Immunisierung des Tieres. (A = Anode, K = Kathode)

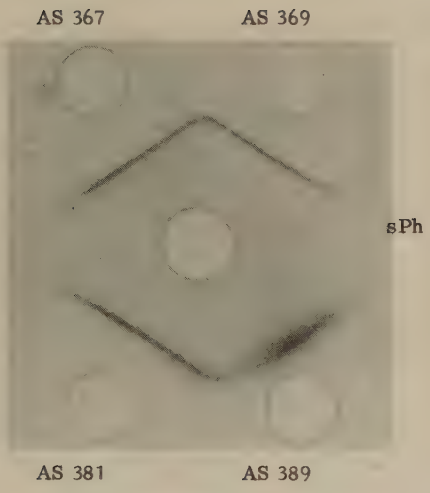


Abb. 4
Geldiffusionstest von saurer Prostata-phosphatase (sPh) gegen 4 Anti-saure-Phosphatase-Seren von Kaninchen (AS). Anfärbung mit Hilfe des BERGschen Reaktionsgemisches.

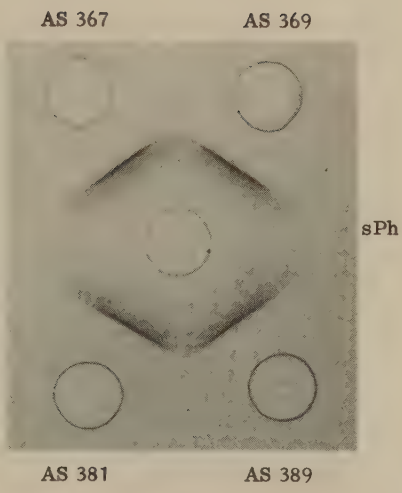


Abb. 5
Geldiffusionstest von saurer Prostata-phosphatase (sPh) gegen 4 Anti-saure-Phosphatase-Seren von Kaninchen (AS). Anfärbung nach LÖFFLER u. BERG-HOFF (20).

(Schwarz-Weiß-Abbildungen)

Um auszuschließen, daß das BERGsche Reaktionsgemisch bzw. die Inkubationslösung nach LÖFFLER u. BERGHOFF auch andere Enzympräzipitationslinien anfärben, trug ich im Handel befindliche Schweineherz-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim) mit einem entsprechenden Kaninchen-Antiserum parallel auf (Abb. 6). Nur die saure Phosphatase enthaltende Präzipitationslinie wurde von dem Reagens nach LÖFFLER u. BERGHOFF angefärbt. Die anschließende Färbung des Präparates mit einem die GOT spezifisch anfärbendem Farbgemisch zeigte lediglich eine Anfärbung der dieses Enzym enthaltenden Präzipitationslinie. In einem Parallelansatz wurde das Präparat mit Amidoschwarzlösung angefärbt (Abb. 7), um die Unterschiedlichkeit der spezifischen Enzymfärbung im Vergleich zur unspezifischen Proteinfärbung der Präzipitate darzustellen. Berücksichtigt man die etwas höhere Empfindlichkeit der Enzymfärbung, dürfte die saure Phosphatase enthaltende Präzipitationslinie (Abb. 6) mit der durch Amidoschwarzlösung darstellbaren Linie (Abb. 7) identisch sein. Auch eine entsprechende Gegenüberstellung zweier mit dem BERGschen Reaktionsgemisch bzw. mit Amidoschwarzlösung gefärbter Präparate läßt auf Identität der Präzipitationslinien schließen (Abb. 8 u. 9).

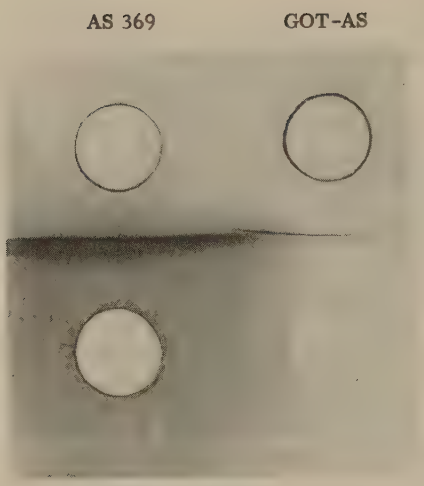


Abb. 6

Geldiffusionstest von saurer Prostataphosphatase (sPh) gegen ein Anti-saure-Phosphatase-Serum (AS 369) und von Schweineherz-GOT (GOT) gegen ein Anti-GOT-Serum (GOT-AS). Anfärbung mit enzymspezifischen Färbeverfahren.

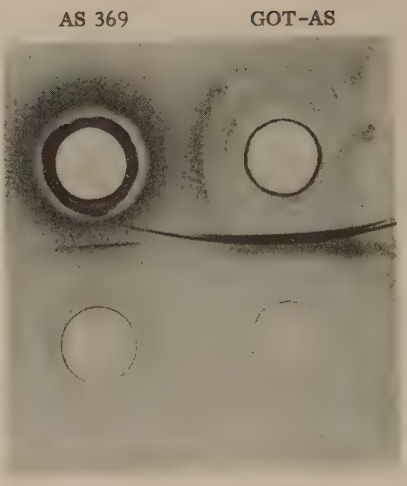


Abb. 7

Legende entsprechend Abb. 6. Proteinfärbung mit Amidoschwarzlösung.

Abb. 8

Geldiffusionstest von saurer Prostataphosphatase (sPh) gegen 2 Anti-saure-Phosphatase-Seren (AS). Anfärbung mit dem BERG-schen Reagens.

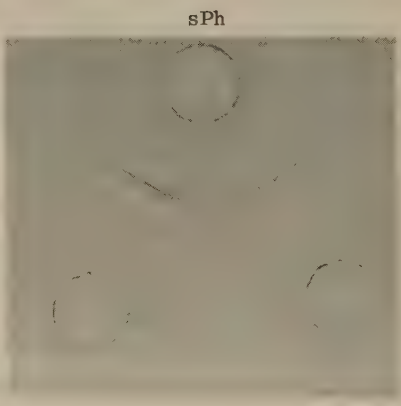


Abb. 9

Legende entsprechend Abb. 8. Proteinfärbung mit Amidoschwarzlösung.

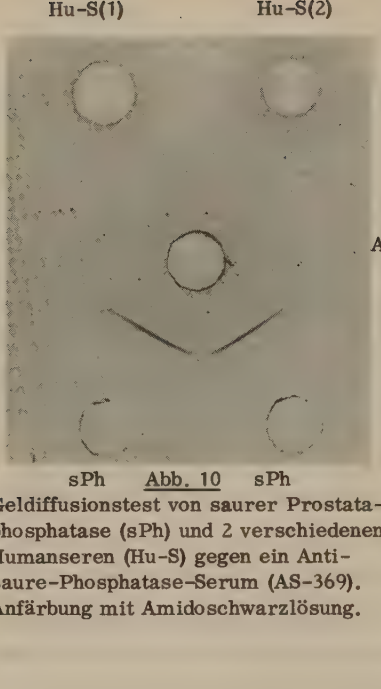
(Schwarz-Weiß-Abbildungen)

Die Proteinfärbung der Geldiffusion von Schweineherz-GOT gegen ein Anti-GOT-Serum zeigt eine weitere, nicht dem Enzym zugehörige Präzipitationslinie, wie aus den Abb. 6 und 7 ersichtlich ist.

Antikörper gegen Serumproteine als Verunreinigung waren in meinen Antiseren gegen saure Phosphatase nicht enthalten, wie die Geldiffusion von zwei Humanseren gegen das Antiserum 369 zeigen möge (Abb. 10).

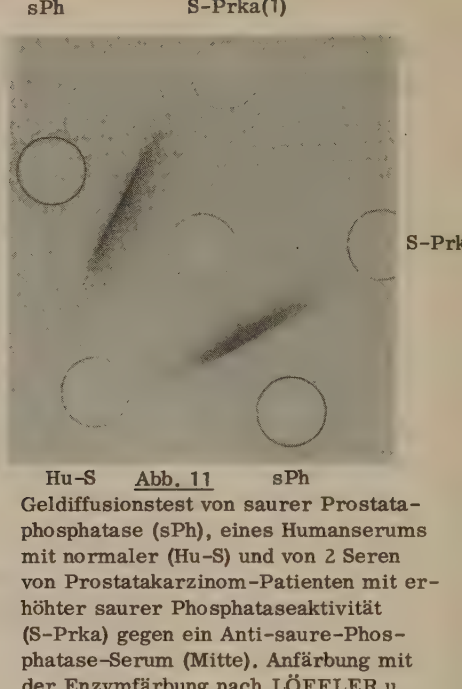
Aus Abb. 10 geht weiter hervor, daß die normalerweise im Serum vorhandene Menge an saurer Prostataphosphatase nicht zur Ausbildung einer Präzipitationslinie ausreicht. Auch mit der empfindlicheren enzymspezifischen Anfärbung der Präparate erhielt ich mit Seren von Gesunden nie eine Präzipitationslinie, überraschenderweise jedoch auch nicht mit zwei Seren von Patienten mit später histologisch gesichertem Prostatakarzinom, obwohl hier der tartratgehemmte Phosphataseanteil 21 mU/ml bzw. 11 mU/ml bei einer Gesamtphosphataseaktivität von 30 bzw. 15 mU/ml im Serum betrug (Abb. 11). Die Phosphatase- bzw. Antikörperkonzentration hätte hier nach den Ergebnissen mit gereinigter saurer Prostataphosphatase zur Präzipitation ausreichen müssen (Abb. 12). Es darf hier an die Befunde von TAGNON u. STEENS-LIEVENS (S.3) erinnert werden, nach denen es sich bei der durch ein Prostatakarzinom freigesetzten Phosphatase um ein Protein abweichender Struktur handelt. Leider war es unmöglich, genügend Seren mit erhöhter saurer Prostataphosphatase bei histologisch gesichertem Prostatakarzinom und Prostatakarzinomgewebe zur Gewinnung saurer Phosphatase zu erhalten, um dieser Frage weiter nachgehen zu können.

Die früher (S. 13) beschriebene zweite schwächere Präzipitationslinie im α-Globulin-Bereich kommt auf den Abb. 7, 9 und 10 nicht zur Darstellung, da zu diesen Versuchen nur die Seren der mit Aluminiumhydroxydgel als Adjuvans immunisierten Tiere verwandt wurden. Diese Linie trat, wie schon dargelegt, nur bei dem Serum des Tieres auf, bei dem komplettes FREUNDsches Adjuvans bei der Immunisierung benutzt worden war. Die Enzymfärbungen (Abb. 4 u. 5) zeigen, daß in diesem Präzipitat keine saure Phosphatase gebunden ist.



sPh Abb. 10 sPh

Geldiffusionstest von saurer Prostataphosphatase (sPh) und 2 verschiedenen Humanseren (Hu-S) gegen ein Anti-saure-Phosphatase-Serum (AS-369). Anfärbung mit Amidoschwarzlösung.



Hu-S Abb. 11 sPh

Geldiffusionstest von saurer Prostataphosphatase (sPh), eines Humanserums mit normaler (Hu-S) und von 2 Seren von Prostatakarzinom-Patienten mit erhöhter saurer Phosphataseaktivität (S-Prka) gegen ein Anti-saure-Phosphatase-Serum (Mitte). Anfärbung mit der Enzymfärbung nach LÖFFLER u. BERGHOFF (20). (Schwarz-Weiß-Abb.)

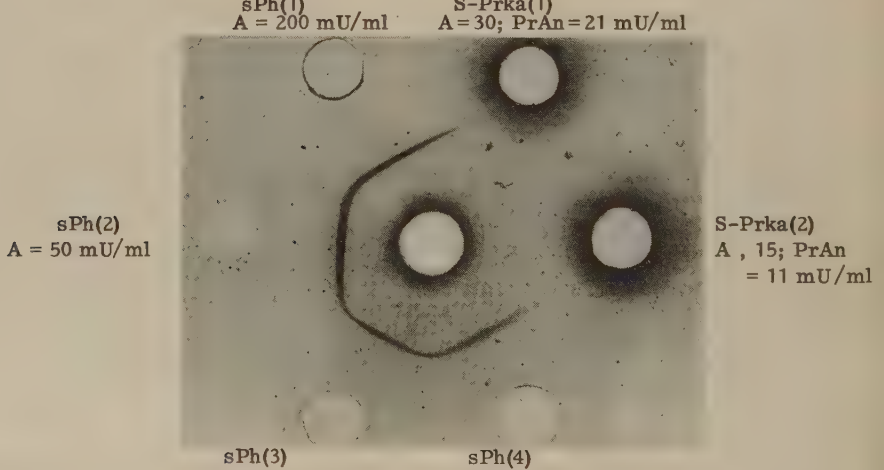


Abb. 12

Geldiffusionstest von saurer Prostataphosphatase (sPh) in verschiedenen Konzentrationen und von 2 Seren von Prostatakarzinom-Patienten mit erhöhter saurer Phosphataseaktivität (S-Prka) gegen ein Anti-saure-Phosphatase-Serum (Mitte). Enzymfärbung nach LÖFFLER u. BERGHOFF (Schwarz-Weiß-Abb.). A = Aktivität, PrAn = tartratgehemmter Anteil.

C. Einfluß der Antiseren gegen saure Prostataphosphatase auf die Aktivität dieses Enzyms

Da von einer Reihe von Enzymen bekannt ist, daß sie durch ihre Antiseren eine starke Hemmung ihrer Aktivität erfahren, lag es für mich nahe, den Einfluß der Anti-saure-Phosphatase-Seren auf die Aktivität der sauren Phosphatase zu untersuchen.

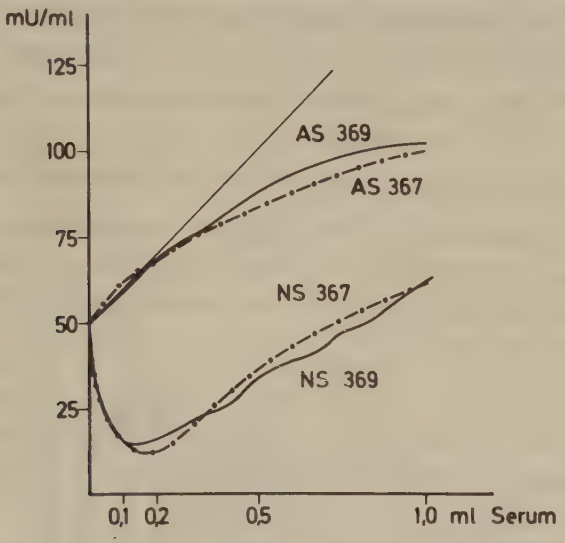


Abbildung 13

Einfluß von Kaninchenseren auf die Aktivität der sauren Prostataphosphatase vor (= NS) und nach (= AS) der Immunisierung der Tiere mit dem Enzym.
Die durchgehende schräge Linie gibt die theoretisch zu erwartende Aktivität (= Aktiv. d. sauren Prostataphosphatase plus Aktiv. der zugefügten Serummenge) an.

Es darf vorausgeschickt werden, daß meine Untersuchungen hier prinzipiell andersgeartete Verhältnisse ergaben, als sie bei einer Reihe in dieser Hinsicht gut untersuchter Enzyme, insbesondere der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase, vorliegen. Bei allen im folgenden dargestellten Phänomenen verhielten sich die Seren der vier immunisierten Tiere gleich, so daß der Übersicht halber die Verhältnisse nur an einem bzw. zwei Seren dargestellt werden.

Fügt man zu einer konstanten Menge der von mir isolierten sauren Prostataphosphatase (50 mU/ml) steigende Mengen eines Antiserums hinzu, zeigt sich bei kleinen Antiserummengen zunächst keinerlei Effekt (Abb. 13). Mit weiter zunehmender Serummenge tritt

dann eine schnell wachsende Hemmung der Enzymaktivität auf; d.h. die Differenz zu der rechnerisch ermittelten möglichen Aktivität (= Aktivität der sauren Prostataphosphatase + saure Phosphataseaktivität des Antiserums) wird ständig größer.

Anders verhalten sich die zur Kontrolle mitgeführten normalen Kaninchenseren, d.h. die Seren, die den Tieren jeweils vor der Immunisierung mit dem Enzym abgenommen wurden. Es findet sich hier schon bei Zugabe kleiner Serummengen eine zunehmende Hemmung der Phosphataseaktivität, die dann aber nach Erreichung eines Hemmungsmaximums (ungefähr bei 0,16 ml zugefügtem Serum) wieder eine rückläufige Tendenz zeigt. Die Antiseren weisen also den Normalseren gegenüber eine deutlich verminderte Enzymhemmwirkung auf, und zwar die stärkste bei relativ kleinen Serummengen.

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei den aufgezeigten Phänomenen um eine spezifische Antikörperwirkung, die Wirkung anderer Serumproteine, kleinmolekularer Serumbestandteile oder lediglich um einen unspezifischen Eiweißeffekt handelt, führte ich weitere Untersuchungen durch.

Zur Ausschaltung des Einflusses kleinmolekularer Substanzen wiederholte ich die Messungen mit denselben Seren, jedoch nach vorheriger 48stündiger Dialyse gegen phys. Kochsalzlösung (Abb. 14). Nach der Dialyse wurden die Seren wieder auf den

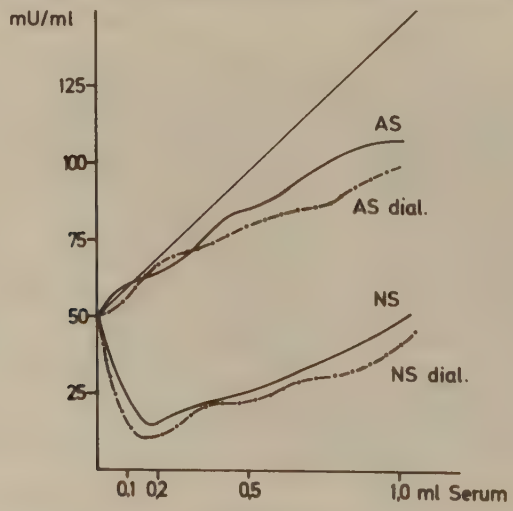


Abbildung 14

Einfluß eines nativen Kaninchenserums auf die Aktivität der sauren Prostataphosphatase vor (= NS) und nach (= AS) Immunisierung des Tieres mit dem Enzym im Vergleich mit den gleichen Seren nach vorheriger 48stündiger Dialyse gegen phys. NaCl-Lösung (= NS dial. bzw. AS dial.). Bezüglich der Bedeutung der durchgehenden schrägen Linie s.Abb.13.

gleichen Eiweißgehalt eingeengt, den sie vor der Dialyse aufwiesen. Es ergab sich kein wesentlicher Unterschied zu den oben dargestellten Befunden, so daß dialysable Substanzen keine Rolle spielen.

Es lag die Annahme nahe, daß die Enzymhemmung durch Seren nicht immunisierter Kaninchen von Fall zu Fall stärker variiert. Ich untersuchte deshalb den Einfluß von 10 Seren nicht immunisierter Tiere auf die Enzymaktivität verglichen mit dem Einfluß meiner 4 Antiseren (Abb. 15). Die 10 Normalseren hemmen das Enzym unterschiedlich,

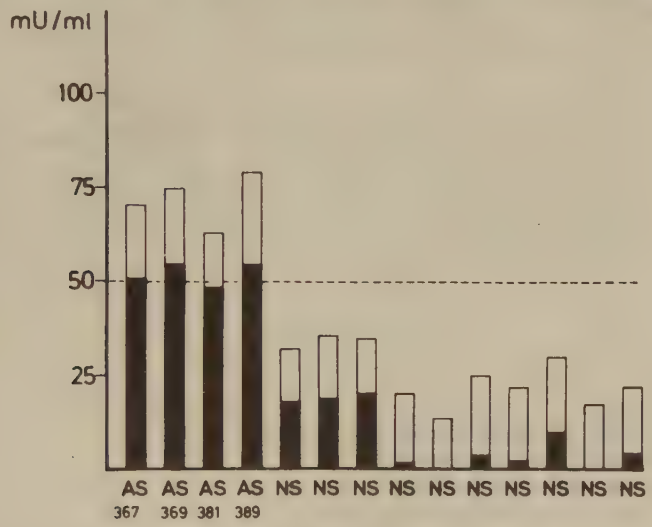


Abbildung 15

Darstellung der Wirkung 10 verschiedener Kaninchenseren (= NS) und 4 verschiedener Anti-saure-Phosphatase-Seren von Kaninchen (= AS) auf die Aktivität der sauren Prostataphosphatase.
Waagerechte Linie: Aktivität der sauren Prostataphosph. Gesamte Säulenhöhe: Wirklich gemessene Aktiv. (= Aktiv. der sauren Prostataphosph. plus Aktiv. des Kaninchen-Serums). Der schwarz umrandete Teil der Säule entspricht dem Anteil der Prostataphosph. an der gemessenen Aktivität. Die jeweils zugefügte Serummenge betrug 0,2 ml.

nämlich entsprechend der Differenz zwischen waagerechter gestrichelter Linie (= Aktivität der sauren Prostataphosphatase ohne Serumzusatz) und den schwarzen NS-Säulen (= Enzymaktivität nach Zusatz von Normalseren, aber nach Abzug der eigenen in den Seren vorhandenen sauren Phosphataseaktivität = weißer Säulenanteil). Diese Hemmwirkung der Normalseren entfällt bei Zusatz von Antiseren. Dort resultiert nach

Tabelle II

Untersuchung der Mittelwerte der beiden in Abb. 15 dargestellten Meßreihen auf signifikante Unterschiedlichkeit.

Meßwerte bei Verwendung von AS mU/ml	X^2	Meßwerte bei Verwendung von NS mU/ml	X^2
69,0	7,3	31,3	49,0
74,9	10,0	35,0	114,0
62,5	85,0	34,5	104,0
80,4	76,0	18,8	30,5
		12,7	135,0
		25,0	4,9
		21,2	9,7
		29,5	27,0
		16,1	68,0
		19,0	28,0
$M_2 = 71,7$	$\Sigma X^2 = 178,3$	$M_2 = 24,3$	$\Sigma X^2 = 570,1$
$\sigma = \pm 7,7$ $\sigma_{M_2} = \pm 3,9$		$\sigma = \pm 8,0$ $\sigma_{M_2} = \pm 2,5$	
$M_1 - M_2 = 47,4$ $\sigma_{M_1 - M_2} = 4,7$ P-Wert: $< 0,0027$			

M_1, M_2 = Mittelwerte.
X^2 = Abweichung des Einzelwertes vom Mittelwert zum Quadrat.
σ = mittlerer Fehler der Einzelmessung.
σM_1, σM_2 = mittlerer Fehler der Mittelwerte.
P-Wert: siehe Text. NS u. AS: siehe Abb. 15.

Abzug der Eigenaktivität der Seren etwa die zu erwartende Phosphataseaktivität. Die Antiseren üben also im Vergleich zu den Seren nicht immunisierter Tiere in dem dargestellten Konzentrationsbereich eine deutliche "relative Aktivierung" auf das Enzym aus. Dieser Unterschied zwischen Antiseren und Normalseren war signifikant (Tab. II), d.h. der Grad der Wahrscheinlichkeit, daß der Unterschied der beiden Mittelwerte nur zufällig war (= P-Wert), war kleiner als der durch Übereinkunft festgelegte Wert von 0,0027.

Die Meßwerte in Tab. II entsprechen der gesamten Säulenhöhe in Abb. 15. Die Einbeziehung der Eigenaktivitäten der Seren in die Berechnung ist hinsichtlich der Signifikanz der beiden Meßreihen bedeutungslos, da alle benutzten Seren annähernd die gleiche Eigenaktivität aufwiesen.

Eine endgültige Klärung der Frage, ob hier eine spezifische Antikörper wirkung vorliegt, war nur durch getrennte Untersuchung der Wirkung der Gammaglobuline eines Antiserums im Vergleich zur Gammaglobulinwirkung eines normalen Kaninchenserums zu erwarten. Ich führte daher eine Fällung der Gammaglobuline mit Ammoniumsulfat durch und untersuchte diese im Vergleich zu den bei der Fällung im Überstand verbleibenden restlichen Proteinen. Der Eiweißgehalt der geprüften Lösungen wurde auf denjenigen der nativen Seren eingestellt. Das aus einem Antiserum isolierte Gammaglobulin bewirkt eine deutliche Enzymaktivierung (Abb. 16). Diese tritt bereits bei sehr kleinen Globulinzugaben auf und strebt dann schnell der maximal möglichen Aktivierung zu.

Bei Betrachtung der Abb. 16 ist zu bedenken, daß alle Kurvenwerte über 50 mU/ml eine echte Aktivierung des Enzyms anzeigen, da die geprüften Globulinlösungen keine eigene saure Phosphataseaktivität aufwiesen. Demgegenüber zeigen in der Abb. 13 nur die über der schrägen Linie liegenden Werte eine echte Enzymaktivierung an, da hier die recht hohe eigene Aktivität der nativen Kaninchenseren berücksichtigt werden muß.

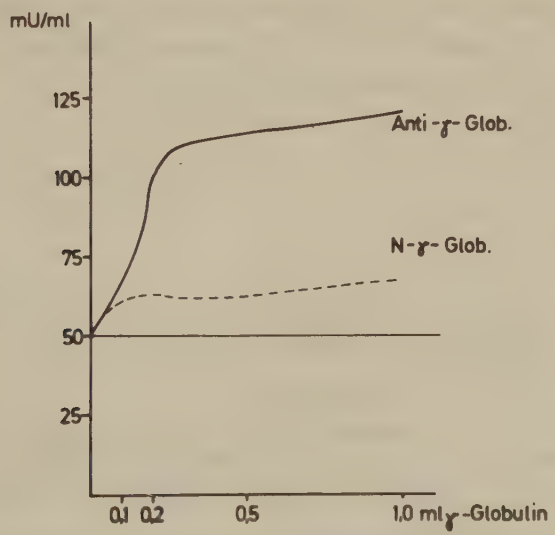


Abbildung 16

Einfluß des γ-Globulins eines Kaninchenserums auf die Aktivität der sauren Prostataphospatase vor (= γ-Glob.) und nach (= Anti-γ-Glob.) der Immunisierung des Tieres mit dem Enzym.
Die durchgehende waagerechte Linie stellt die theoretisch zu erwartende Aktivität (= Aktiv. d. sauren Prostataphosphatase) dar.

Zweifellos wird der Kurvenverlauf bei weiter ansteigender Aktivität auch durch das begrenzte Substratangebot beeinflußt, d.h. ein weiterer Anstieg der Kurve wird verhindert. Nach von mir durchgeführten orientierenden Untersuchungen kommt diese Tatsache jedoch in dem dargestellten Bereich nicht zum Tragen, da das Substrat stets im Überschuß vorhanden ist.

Auffälligerweise zeigt auch das aus einem Normalserum, d.h. aus einem Serum, das dem gleichen Tier vor dessen Immunisierung abgenommen wurde, isolierte Gammaglobulin einen aktivierenden Effekt auf das Enzym, der allerdings bedeutend geringer ist (Abb.16). Auch diese Aktivierung ist trotz steigender Proteinkonzentrationen begrenzt.

Die Wirkung der bei der Gammaglobulinfällung im Überstand verbleibenden Proteine auf die Enzymaktivität ist bei Antiseren und Normalseren annähernd die gleiche (Abb. 17). Beide Proteinlösungen zeigen in kleinen Konzentrationen eine starke Hemmwirkung auf das Enzym, die dann bei weiterer Erhöhung der Proteinzugabe allmählich wieder verlorengeht. Der Verlauf beider Kurven erinnert an den Einfluß von normalem nativen Kaninchenserum auf das Enzym (Abb. 13). Die Hemmwirkung tritt jedoch deutlicher hervor. Es wurde nicht weiter untersucht, ob sich der hemmende Einfluß auf ein bestimmtes in der Lösung vorhandenes Protein zurückführen läßt.

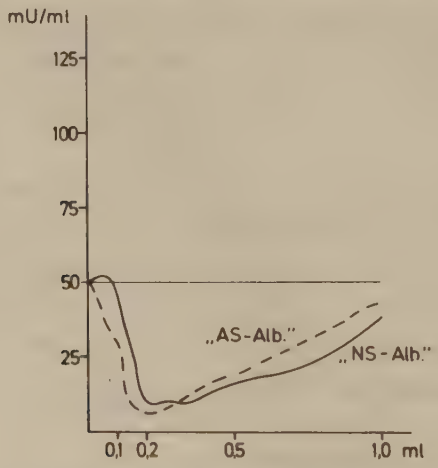


Abbildung 17

Einfluß der bei der γ-Globulin-Fällung im Überstand verbleibenden Proteine eines Kaninchenserums auf die Aktivität der sauren Prostataphosph. vor (= "NS-Alb.") und nach (= "AS-Alb.") der Immunisierung des Tieres mit dem Enzym.
Die durchgehende waagerechte Linie stellt die theoretisch zu erwartende Aktivität (= Aktiv. d. sauren Prostataphosph.) dar.

Es sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, daß die Proteinkonzentration der geprüften Lösungen (Abb. 16 u. 17) derjenigen eines nativen Serums entspricht, d.h. aber, daß z.B. der Gammaglobulingehalt etwa viermal so hoch ist wie in einem nativen Serum. Dies ist beim Vergleich der Abb. 13 und 16 bzw. 17 zu berücksichtigen.

Die dargestellten Proteineinwirkungen auf das Enzym (Abb. 13, 15, 16 und 17) sind in folgendem zusammengefaßt:

Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied in der Enzymaktivitätshemmung durch 4 Antiseren und der nicht immunologischen Hemmung durch 10 Normalseren. Die Hemmung durch die Antiseren ist bedeutend geringer, es kommt also zu einer relativen Aktivierung der sauren Prostataphosphatase. Daß es sich dabei um eine spezifische Antikörperwirkung handelt, zeigen die Versuche mit der isolierten Gammaglobulinfraktion aus Antiseren und Normalseren. In Übereinstimmung damit läßt sich mit den bei der Gammaglobulinfällung im Überstand verbleibenden Proteinen kein Unterschied in der Beeinflussung des Enzyms durch Antiseren und Normalseren nachweisen.

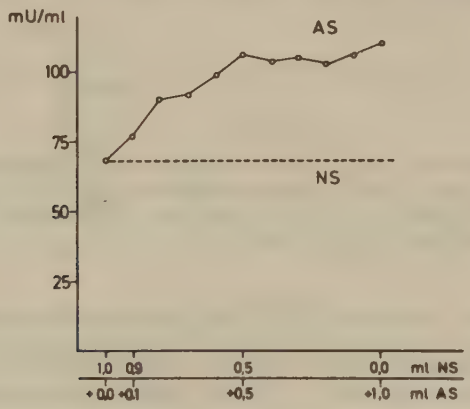


Abbildung 18

Wirkung eines Kaninchenserums auf die Aktivität der sauren Prostataphosphatase vor (= NS) und nach (= AS) Immunisierung des Tieres mit dem Enzym. Der Proteingehalt entspricht bei jeder Messung dem von 1,0 ml Serum.

Durch weitere Untersuchungen waren diese Befunde zu bestätigen:

Gibt man zu einer konstanten Menge des Enzyms 1.0 ml Serum eines nicht immunisierten Tieres und ersetzt dann schrittweise dieses durch ein Antiserum, so ist zu erwarten, daß die unterschiedliche Wirkung der beiden Seren auf das Enzym ohne den unspezifischen Einfluß des Proteins, dessen Konzentration ja bei allen Messungen gleich

ist, zur Darstellung kommt (Abb. 18). Die beiden Seren gemeinsame Wirkung auf die Enzymaktivität ist durch die waagerechte unterbrochene Linie (= NS) dargestellt, die mit AS bezeichnete Kurve zeigt die durch die spezifische Antikörperwirkung auftretende Abweichung an.

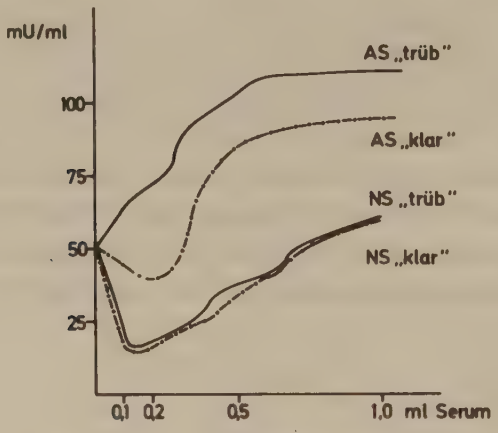


Abbildung 19

Einfluß eines Kaninchenserums auf die Aktivität der sauren Prostataphosphatase vor (= NS "trüb") und nach (= AS "trüb") Immunisierung des Tieres mit dem Enzym. Zum Vergleich die in dem Phosphatase/Serum-Gemisch nach hochtouriger Zentrifugation meßbare Aktivität (= NS "klar" bzw. AS "klar").

Ein weiterer Beweis für das Wirksamwerden einer Antigen-Antikörper-Reaktion bei Zugabe eines Antiserums ist in Abb. 19 dargestellt. In diesem Falle wurden Gemische aus saurer Prostataphosphatase und verschiedenen Anti- und Normalserummengen nach einer Inkubationszeit von 45 Min. hochtourig abzentrifugiert (20 000 U/min, 43 g) und dann die im Überstand meßbare Aktivität der des nicht zentrifugierten Gemisches gegenübergestellt. Bei Verwendung eines Normalserums ergibt sich keinerlei Unterschied der Enzymaktivität in den einzelnen Gemischen vor und nach Zentrifugieren, während bei Verwendung eines Antiserums eine deutliche Abweichung auftritt; und zwar ist die Aktivität in den Gemischen nach Zentrifugieren geringer. Dieser Befund spricht sehr dafür, daß sich bei Verwendung eines Antiserums ein hochmolekularer Antigen-Antikörper-Komplex bildet, der nach dem Zentrifugieren im Bodensatz zu finden ist und dementsprechend bei der Aktivitätsmessung dann nicht mehr erfaßt wird. Da bei Ver-

wendung von Normalserum diese hochmolekularen Komplexe selbstverständlich nicht gebildet werden, ist hier die Aktivität vor und nach Zentrifugierung unverändert.

Die Verlängerung der Inkubationszeit eines Enzym/Antiserum-Gemisches führt zu einer Steigerung der Aktivität (Abb. 20, oberer Teil). Auch diese Tatsache spricht für das Wirksamwerden einer Antigen Antikörper-Reaktion, da unspezifische aktivierende bzw. hemmende Faktoren im allgemeinen keine solche ausgeprägte Abhängigkeit von der Inkubationszeit zeigen (Abb. 20, unterer Teil).

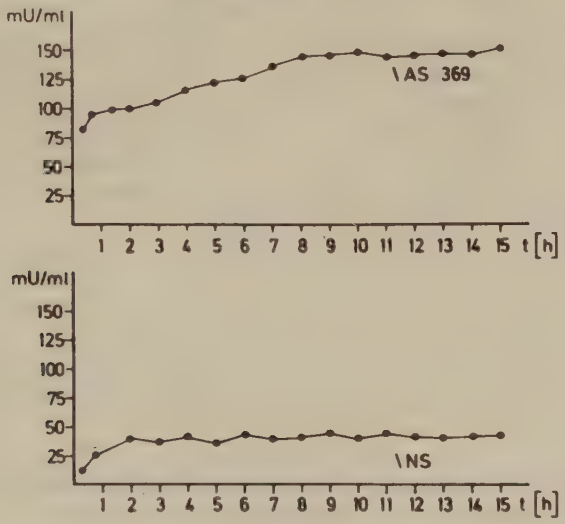


Abbildung 20

Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die Reaktion zwischen saurer Prostataphosphatase und einem Kaninchenserum vor (= NS) und nach (= AS) Immunisierung des Kaninchens mit dem Enzym. Enzym und Serummenge wurden bei allen Messungen gleich gewählt.

Schließlich stellte sich die Frage, welchen Einfluß das Anti-saure-Phosphataseserum auf die Aktivität der normalerweise im Serum eines gesunden Menschen vorhandenen sauren Phosphatase ausübt, die ja Anteile aus den verschiedensten Organen enthält und deren Prostataanteil nur sehr gering ist (Abb. 21, lks. oben). Weiter interessierte es, welcher Einfluß auf die beim Prostatakarzinom im Serum erhöhte saure Phosphatase ausgeübt wird (Abb. 21, unterer Teil).

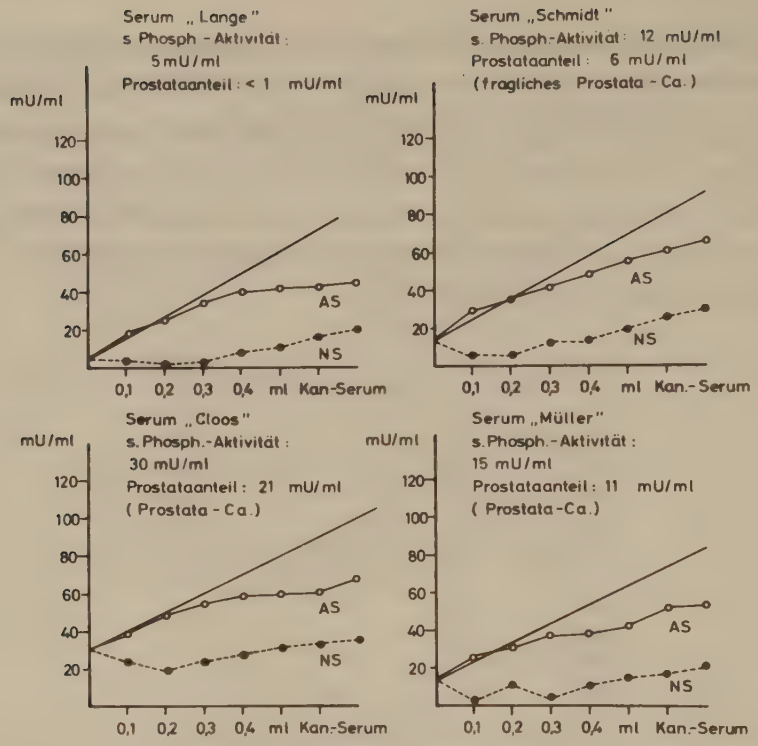


Abbildung 21

Einfluß von Kaninchenseren, vor (= NS) und nach (= AS) Immunisierung der Tiere mit saurer Prostataphosphatase, auf die Aktivität der sauren Phosph. in verschiedenen Humanseren.
Die schräge durchgehende Linie entspricht den theoretisch zu erwartenden Aktivitäten (= Aktivität des Humanserums plus Aktivität des Kaninchen-Serums). Der Prostataanteil der sauren Phosphatase wurde durch die Tartrathemmung bestimmt.

Es wurden jeweils 0,2 ml Serum eines gesunden Menschen (Serum "Lange"), eines Patienten mit fraglichem Prostatakarzinom (Serum "Schmidt") und von zwei Patienten mit gesichertem Prostatakarzinom (Serum "Cloos" u. Serum "Müller") mit steigenden Antiserummengen inkubiert. Zur Kontrolle wurden wiederum die gleichen Versuche mit normalem Kaninchenserum, d.h. Serum, das dem Tier vor dessen Immunisierung entnommen wurde, durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug auch bei diesen Versuchen 45 Minuten.

Abgesehen von der unterschiedlichen Ausgangsaktivität ergab sich kein Unterschied zwischen den 4 verschiedenen Humanseren, insbesondere war kein Unterschied zwischen dem normalen Humanserum und den Seren von Patienten mit einem Prostatakarzinom

zu finden. Es zeigte sich lediglich wiederum der gleiche schon beobachtete Effekt: stärkere Hemmung der Phosphatase durch normale Kaninchenseren, deutlich geringere Hemmung durch die Anti-saure-Phosphatase-Seren.

Diskussion

Das Serum nicht immunisierter Kaninchen enthält nach den Ergebnissen meiner Versuche zwei Proteinfaktoren mit gegensätzlicher Wirkung auf die saure Phosphatase aus menschlichem Prostatagewebe. Es existiert in der Nicht-Gammaglobulinfraktion eine die saure Phosphatase deutlich hemmende, nicht dialysable Substanz (bei der Gammaglobulinfällung mit Ammoniumsulfat im Überstand verbleibend). Bei Erhöhung der Serumzugabe interferiert mit diesem Effekt in immer stärkerem Maße eine relativ enzymaktivierende, die saure Phosphatase stabilisierende Proteinkomponente. Dieser Interferenzeffekt ist schließlich so stark, daß die bei kleinen Proteinkonzentrationen beobachtete Hemmung wieder verloren geht. Im Gegensatz zur Hemmwirkung zeigt sich die aktivierende Wirkung auch bei Verwendung nur der Gammaglobulinfraktion des Serums nicht immunisierter Kaninchen. Eine ähnliche unspezifisch "stabilisierende" Wirkung von Proteinen auf Enzymaktivitäten ist auch für andere Enzyme bekannt (26).

Nach diesen Ergebnissen ist eine Gesamtwirkung des nativen Kaninchenserums zu erwarten, die die Resultante ist aus der Wirkung der daraus isolierten Gammaglobuline und der Wirkung der verbleibenden Restproteine. Wie in Abb. 13, 16 und 17 gezeigt wird, läßt sich diese Annahme weitgehend experimentell erfüllen, wobei allerdings die Proteinkonzentrationsunterschiede zu berücksichtigen sind (siehe S. 25).

Anscheinend ist die hemmende Wirkung des Serums kein Albumineffekt; zumindest läßt sie sich nicht mit Humanalbumin in gleicher Konzentration repoduzieren. Hier wären zur weiteren Abklärung Versuche mit Kaninchenalbumin sowie Kaninchen-alpha- und -beta-Globulinen erforderlich. Für meine Fragestellungen interessierten diese Untersuchungen nur am Rande.

Die relativ aktivierende Wirkung der Anti-saure-Phosphatase-Seren auf das Enzym bzw. die verminderte Hemmwirkung im Vergleich zu den Seren nicht immunisierter Kaninchen läßt sich auf den Einfluß der Antikörper-Gammaglobuline zurückführen (Abb. 16), wie einmal der unterschiedliche Einfluß der isolierten Gammaglobuline aus Anti- und Kontrollseren und zum anderen der nicht unterschiedliche und andersartige Einfluß der bei Ammoniumsulfatfällung im Überstand verbleibenden Proteine aus Anti- und Kontrollseren zeigt. Die Wirkung eines Antiserums setzt sich danach aus folgenden Einzelkomponenten zusammen: erstens aus der spezifischen aktivierenden Wirkung der Enzym-Antikörper-Globuline, zweitens aus der hemmenden Wirkung eines anderen noch unbe-

kannten Proteins von Nicht-Gammagobulin-Natur und drittens aus der unspezifischen aktivierenden Wirkung verschiedener Proteine. Das Enzym-Antikörper-Globulin zeigt dementsprechend den aktivierenden Effekt der nativen Antiseren in verstärktem Maße, da die hemmende Komponente mit der Globulinisolierung entfällt.

Diese komplexe Überlagerung dreier Wirkkomponenten macht es verständlich, daß in weniger detailliert ausgeführten Untersuchungen "keine hemmende Wirkung" von Antikörpern gegen saure Phosphatase aus menschlichem Samenplasma beobachtet wurde (18). Von einer "absoluten" Aktivierung der sauren Prostataphosphatase kann man in den von mir durchgeführten Versuchen nur sprechen, wenn die Aktivität bei Antikörperzusatz ü b e r der Summe der Aktivitäten liegt, die resultiert, wenn man zur Aktivität der geprüften Prostataphosphatase die der Phosphatase im beigefügten Kaninchenserum hinzuaddiert. Dies war jedoch bei Verwendung von nativen Seren eindeutig niemals der Fall.

Hier sind weitere Untersuchungen, insbesondere mit Stoffen, die die in den Kaninchenseren vorhandene saure Phosphatase spezifisch hemmen, d.h. keinen Einfluß auf die humane saure Prostataphosphatase ausüben, erforderlich.

Leider war es mir bisher nicht möglich, genügend Prostatakarzinomgewebe zu erhalten, um analoge Versuche wie mit Prostataadenom- bzw. Normalprostatagewebe mit saurer Phosphatase aus Karzinomgewebe durchzuführen. Bei der im Serum erhöhten Phosphatase beim Prostatakarzinom konnten die bisher dargestellten Befunde in etwa bestätigt werden: Es ließ sich kein Unterschied zwischen der normalerweise im Serum vorhandenen sauren Phosphatase und der beim Prostatakarzinom erhöhten sauren Phosphatase in der Beeinflussung durch meine Antiseren feststellen. Es bleibt daher zweifelhaft, ob auf diesem Wege eine feinere Differenzierung zwischen saurer Phosphatase aus normalem Prostata- bzw. Prostataadenomgewebe und saurer Phosphatase aus Prostatakarzinomgewebe möglich sein wird. Eher könnten die festgestellten Unterschiede in der Immunpräzipitation (S. 17 ff) zum Ziele führen, denn mit zwei Seren von Patienten mit später histologisch gesichertem Prostatakarzinom, die eine starke Erhöhung der sauren Prostataphosphatase (= tartrathemmbarer Phosphataseanteil) aufwiesen, war keine Präzipitationslinie zu erzielen, obwohl die Phosphatase- und Antikörperkonzentrationen zur Präzipitation hätten ausreichen müssen, wie in Parallelversuchen mit gereinigter saurer Prostataphosphatase gezeigt wurde. Dieser Befund könnte auf abweichende Proteinstruktur (und damit Antigenstruktur) der beim Prostatakarzinom freigesetzten

sauren Phosphatase hindeuten, entsprechend den Befunden von TAGNON u. STEENS-LIEVENS die eine abweichende Beeinflussung durch ionisiertes Kalzium feststellten (S. 3).

Weiterer Abklärung bedarf das in der Enzymantikörper-Literatur bisher nur ein weiteres Mal beschriebene Phänomen der immunologischen Aktivierung eines Enzyms.

Zusammenfassung

1. Mit Hilfe zweier verschiedener Verfahren, der selektiven Ammoniumsulfatfällung und der Ionenaustauschchromatographie, wurde saure Phosphatase aus Prostataadenomen isoliert. Beide Enzymchargen zeigten gleiche Antigeneigenschaften.

2. Vier Kaninchen wurden mit dem isolierten Enzym immunisiert und die Enzymspezifität der Antikörper im Geldiffusionstest mit spezifischen Färbeverfahren gesichert.

3. Die Antiseren zeigten eine deutlich geringere Enzymhemmwirkung als die den gleichen Tieren vor der Immunisierung entnommenen Seren. Es resultiert also eine relativ aktivierende Wirkung der Antikörper auf das Enzym.

4. Bei der Immunaktivierung fanden sich keinerlei Unterschiede zwischen der sauren Phosphatase aus Prostataadenomen, der normalerweise im Serum vorhandenen und der beim Prostatakarzinom im Serum erhöhten sauren Phosphatase. Demgegenüber ließ sich bei der Immunpräzipitation mit der beim Prostatakarzinom im Serum erhöhten sauren Phosphatase im Gegensatz zu der aus Normalprostata- bzw. Prostataadenomgewebe isolierten sauren Phosphatase keine Präzipitation erzielen. Es wird eine abweichende Proteinstruktur dieser Phosphatase diskutiert.

Schrifttumsverzeichnis

(1) ABUL-FADL, M.A.M. u. E.J. KING:

Properties of the acid phosphatase of erythrocytes and of the human prostate gland. Biochem. J. 45, 51 (1949).

(2) ANDERSCH, M.A. u. A.J. SZCZYPINSKI:

Use of p-Nitrophenylphosphate as the substrate in determination of serum acid phosphatase.
Americ. J. Clin. Path. 17, 571 (1947).

(3) BABSON, A.L., P.A. READ u. G.E. PHILLIPS:

The importance of the substrate in assays of acid phosphatase in serum.
Americ. J. Clin. Path. 32, 83 (1959).

(4) BARNES, G.W., W.A. SOANES, L. MAMROD, M.J. GONDER u. S. SHULMAN:

Immunologic properties of human prostatic fluid.
J. Lab. a. Clin. Med. 61, 578 (1963).

(5) BERG, S.:

Neue Methoden für die Beweismitteluntersuchung bei Sittlichkeitsdelikten.
Kriminalwissensch. 1, 25 (1954).

(6) BERG, S.:

Methoden zum Nachweis von Genitalsekretspuren.
Dtsch. Zeitschrift ges. gerichtl. Med. 42, 605 (1954).

(7) BOMAN, H.G.:

Purification of prostatic acid phosphatase.
Arkiv för Kemie 12, 453 (1958).

(8) BOMAN, H.G.:

Chromatography of prostatic phosphatase.
Biochim. Biophys. Acta 16, 245 (1955).

(9) DAVIDSON, H.M. u. W.H. FISHMAN:

A simplified purification procedure for human prostatic acid phosphatase based on pH and Ammonium Sulfate fractionation.
J. Biol. Chem. 234, 526 (1959).

(10) ESTBORN, B.:

Lokalization of prostatic serum acid phosphatase by starchgel electrophoresis.
Clin. Chim. Acta 6, 22 (1961).

(11) GRABAR, P. u. C.A. WILLIAMS:

Méthode permettant l'étude conjugée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochim. Biophys. Acta 10, 193 (1953).

(12) GRABAR, P.:

The use of immunochemical methods in studies on proteins. Advances Protein Chem. 13, 1 (1958).

(13) GUTMAN, A.B. u. E.B. GUTMAN:

An "acid" phosphatase occurring in the serum of patients with metastasizing carcinoma of the prostate gland. J. Clin. Invest. 17, 473 (1938).

(14) HUGGINS, Ch. u. P. TALALAY:

Sodium Phenolphthalein Phosphate as a substrate for phosphatase tests. J. Biol. Chem. 159, 399 (1945).

(15) KIRBERGER, E. u. G.A. MARTINI:

Bestimmungsmethode und klinische Auswertung der Phosphataseaktivität im Blut. Dtsch. Arch. klin. Med. 197, 268 (1950).

(16) KUNITZ, M.:

Crystalline inorganic pyrophosphatase isolated from baker's yeast. J. Gen. Physiol. 35, 423 (1952).

(17) LEITHOFF, H. u. U. GENKEL:

Die Herkunft der organspezifischen Proteine des menschlichen Samenplasmas. Med. Welt 39, 2073 (1964).

(18) LEITHOFF, H. u. I. LEITHOFF:

Neue Ergebnisse immunelektrophoretischer Untersuchungen des menschlichen Samenplasmas. Med. Welt 4, 181 (1962).

(19) LINHARDT, K. u. K. WALTER:

Die Bestimmung der Serumphosphatase im klinischen Laboratorium. Röntg. u. Lab. Prax. 7, 113 (1954).

(20) LÖFFLER, H. u. W. BERGHOFF:

Eine Methode zum Nachweis saurer Phosphatase in Ausstrichen. Klin. Wochenschrift 40, 363 (1962).

(21) LUNDQUIST, F., T. THORSTEINSSON u. O. BUUS:

Purification and properties of some enzymes in human seminal plasma.
Biochem. J. 59, 69 (1955).

(22) MOORE, S. u. W.H. STEIN:

Chromatography of Amino Acids on sulfonated polystyrene resins.
J. Biol. Chem. 192, 663 (1951).

(23) PETERSON, C.G. jr.:

Prostatic fraction of acid phosphatase versus total acid phosphatase: reliability in diagnosis and treatment of prostatic cancer.
J. Urol. 85, 643 (1961).

(24) RICHTERICH, R., H. WEBER, B. ENDTNER u. W. v. NIEDERHÄUSERN:

Die Früherfassung des Prostatacarcinoms durch Bestimmung der sauren Prostataphosphatase im Plasma.
Dtsch. Med. Wochenschrift 29, 1421 (1963).

(25) ROSENMUND, H.:

Untersuchungen über die saure Phosphataseaktivität mit besonderer Berücksichtigung der Prostataphosphatase und des Blutserums.
Helvetica Medica Acta A/XXXIII, Vol. 20 (1953).

(26) SCHLAMOWITZ, M.:

The reaction of dog intestinal phosphatase with its antibodies in the region of excess antibody.
J. Immunol. 80, 176 (1958).

(27) TAGNON, H. u. A. STEENS-LIEVENS:

L'inactivation réversible de la phosphatase acide prostatique: action du pH, du temps d'incubation et du sérum sanguin.
Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol. 6, 58 (1961).

(28) TAGNON, H. u. A. STEENS-LIEVENS:

La phosphatase acide de la prostate normale et du carcinome prostatique. Différentiation basée sur l'action du Calcium ionisée.
Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol. 7, 391 (1962).

(29) BIOCHEMICA-TEST "SAURE PHOSPHATASE".

Fa. C.F. Boehringer & Söhne GmbH., Mannheim (1963).

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 18. August 1937 in Kassel geboren. Dort besuchte ich nach dreijähriger Grundschulzeit das Realgymnasium Albert-Schweitzer-Schule, an dem ich 1958 das Abitur bestand. Anschließend wurde ich für ein Jahr zur Bundeswehr eingezogen.

1959 begann ich ein Maschinenbaustudium an der Technischen Hochschule Darmstadt, wechselte dann aber zum SS 1960 an die Universität Marburg über und begann mit dem Medizinstudium. Nach dem Physikum studierte ich vorübergehend in Hamburg und Freiburg und kehrte dann wieder nach Marburg zurück. Am 11. Februar 1966 bestand ich das medizinische Staatsexamen.

Anschließend arbeitete ich zunächst 6 Monate als Medizinalassistent an der Medizin. Univ.-Poliklinik, danach 3 Monate an der Dermatolog. Univ.-Klinik in Marburg. Seit 1. Januar 1967 leiste ich die chirurgische und die geburtshilflich-gynäkologische Medizinalassistentenzeit am Kreiskrankenhaus Holzkirchen/Obb. ab.

Die vorliegende Arbeit begann ich im Januar 1964 in der Isotopen-Abteilung der Medizin. Univ.-Poliklinik Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Lang.

Meine akademischen Lehrer waren die Herrn Professoren und Dozenten:

in Marburg: Behrend, Berendes, Bickel, Braun-Falco, Brück, Bücher, Cleve, Deicher, Dimroth, Dölle, Dorer, Drawert, Exner, Gedigk, Golenhofen, Grabowski, Grebe, Grüter, Hamm, Hardewig, Hartmann, Hensel, Hess, Hildebrandt, Jacob, Kottmeyer, Lang, Linneweh, Lübbers, Mahr, Marx, Mattes, Maurath, Neubauer, Niessing, Oehme, Oehmig, Oksche, Petry, Petzoldt, Poetschke, Rodenhäuser, Rohen, Salfeld, Sauer, Schermuly, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmidt, Schmitz, Schrappe, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Spiegelberg, Stender, Straub, Streicher, Vogell, Vogt, Walcher, Wegerle, Wendt, Würterle.

in Hamburg: Bartelheimer, Bettendorf, Bochnik, Dietel, Dörken, Gadermann, Harders, Harmsen, Hornbostel, Krauspe, Kuhlencordt, Luckner, Maaß, Martini, Mittelstraß, Ritter, Roemer, Schmidt-Rohde, Schulz, Stelzner, Zukschwerdt.

in Freiburg i.Brg.:
Bätzner, Büchner, Dietz, Eschler, Goepfert, Hahlbrock, Hauf, Heilmeyer, Hummel, Klöss, Könn, Krauß, Lorenz, Noetztel, Oehlert, Rehm, Schuhmacher, Stutz, Wimhöfer, Wetzel.